

PROLONGED RELEASE PREPARATION CAPABLE OF INJECTION

Publication number: JP5194273 (A)

Publication date: 1993-08-03

Inventor(s): NOOMAN DEIRU BURUTSUKUSU; GUREGORII FURANKU
NIIDAMU +

Applicant(s): LILLY CO ELI +

Classification:


- international: **A61K38/04; A61K38/25; A61K38/27; A61K47/06; A61K47/14;
A61K9/00; A61K9/08; C07K14/60; A61K38/00; A61K38/04;
A61K38/25; A61K38/27; A61K47/06; A61K47/14; A61K9/00;
A61K9/08; C07K14/435; A61K38/00; (IPC1-7): A61K37/36;
A61K37/43; A61K47/06**

- European: A61K38/25; A61K38/27; A61K47/14; A61K9/00M5; C07K14/60

Application number: JP19920260027 19920929

Priority number(s): US19910769555 19911001; US19920934017 19920821

Also published as:

 EP0535899 (A1)
 NZ244550 (A)
 NO923763 (A)
 MX9205508 (A)
 HU66070 (A2)

more >>

Abstract of **JP 5194273 (A)**

PURPOSE: To obtain the subject formulation capable of largely reducing labors for administering a growth hormone or a growth hormone-releasing factor into an animal many times. **CONSTITUTION:** This injectable extended release formulation contains a growth hormone or growth hormone-releasing factor in a carrier containing a biocompatible hydrophobic medium and a polyglycerol ester in an amount effective for extending the release of the growth hormone or growth hormone-releasing factor into an animal. The method for preparing the formulation, and the method for administering the preparation into the animal.

.....
Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(19)日本国特許庁（J P）

(12) 公 開 特 許 公 報（A）

(11)特許出願公開番号

特開平5-194273

(43)公開日 平成5年(1993)8月3日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 47/06	C	7433-4C		
37/36		8314-4C		
37/43		8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数9(全13頁)

(21)出願番号	特願平4-260027	(71)出願人	590005922 イーライ・リリー・アンド・カンパニー E L I L L Y A N D C O M P A N Y アメリカ合衆国46285インディアナ州イン ディアナポリス市、リリー・コーポレイ ト・センター（番地の表示なし）
(22)出願日	平成4年(1992)9月29日	(72)発明者	ノーマン・デイル・ブルックス アメリカ合衆国46140インディアナ州グリ ーンフィールド、イースト・スリーハンド レッド・ノース5923番
(31)優先権主張番号	7 6 9 5 5 5	(74)代理人	弁理士 青山 葆（外1名）
(32)優先日	1991年10月1日		
(33)優先権主張国	米国（U S）		
(31)優先権主張番号	9 3 4 0 1 7		
(32)優先日	1992年8月21日		
(33)優先権主張国	米国（U S）		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 注射可能な長期放出製剤

(57)【要約】

【構成】 動物における成長ホルモンまたは成長ホルモ
ン放出因子の放出を延長するに有効な量のポリグリセロ
ールエステルと生物適合性の疎水性媒体を含む担体中に
成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子を含有する注
射可能な長期放出製剤が提供される。また、このような
製剤の製造方法およびそれを動物に投与する方法が提供
される。

【効果】 本発明の製剤は、動物に成長ホルモンまたは
成長ホルモン放出因子を多数回投与する手間を大きく減
少させることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物において成長ホルモン関連物質の放出を延長するための有効量のポリグリセロールエステルならびに生物適合性の疎水性媒体を含む担体中に成長ホルモンおよび成長ホルモン放出因子からなる群から選ばれる成長ホルモン関連物質を含有する注射可能な長期放出製剤。

【請求項2】 ポリグリセロールエステルが完全にエステル化されたものである請求項1記載の製剤。

【請求項3】 成長ホルモン関連物質が成長ホルモン放出因子である請求項1または2記載の製剤。

【請求項4】 成長ホルモン関連物質が担体と単に混合されているものである請求項1～3のいずれかに記載の製剤。

【請求項5】 成長ホルモン放出因子がp-メチルヒプロイルpGRF (2-76)OHである請求項1～4のいずれかに記載の製剤。

【請求項6】 生物適合性の疎水性媒体が油である請求項1～5のいずれかに記載の製剤。

【請求項7】 ポリグリセロールエステル中のエステルがラウリン酸エステル、ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、ステアリン酸エステル、アラキン酸エステル、ベヘン酸エステル、リグノセリン酸エステル、パルミトール酸エステル、オレイン酸エステル、リノール酸エステル、リノレン酸エステルおよびアラキドン酸エステルからなる群から選ばれる請求項1～6のいずれかに記載の製剤。

【請求項8】 ポリグリセロールエステルが動物において成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子の放出を延長するに有効な量で含まれるようにして、成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子をポリグリセロールエステルと生物適合性の疎水性媒体とを含む担体中に導入し、注射可能な製剤とすることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載の製剤の製造方法。

【請求項9】 請求項1～7のいずれかに記載の注射可能な長期放出製剤を動物に注射することを特徴とする動物の成長を増加させる方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【産業上の利用分野】本発明は一般的に言う動物に生物活性物質を投与することに関する。さらに具体的には、本発明は、動物において成長ホルモンや成長ホルモン放出因子などの巨大分子を長期放出させるための方法および注射可能な組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】最近の数年間、長期にわたって成長ホルモン、成長ホルモン放出因子およびその他の生物活性物質で動物を処置するためのコスト効率の高い方法を発見することに大きな努力が払われている。効率的な長期放出(一般に、「持続」または「延長」または「制御」放

出とも称される)のための組成物および方法を達成することがこれら努力の中心になっている。これらの組成物および方法は、投与の後に長期にわたって有効量の生物活性物質を放出するように設計される。これにより、全体の処置処方における投与の回数を減らすことによって作業コストが減少する。また、物質の長期放出は、例えば消費のために飼育される動物の放牧飼育中などのように、他の方法では処置を行なうことができない状況下での処置を可能にする。さらに、効率的な長期放出は、生物活性物質の血漿レベルの大きな変動(即ち、通常为非長期放出製剤を注射したときに発生する最初は高すぎ、次いで急速に低すぎるレベルになる)を回避する。

【0003】動物において成長ホルモンや成長ホルモン放出因子などの成長ホルモン関連物質の長期放出を与える、改良された注射可能な組成物および方法が必要とされている。この組成物は容易に入手できる原料を用いて容易に製剤化されるのが好ましく、その製造方法は活性物質に損傷を与える可能性のあるものではないことが好ましい。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明はこれらおよびその他の必要性を満たすものであり、好ましい態様の1つでは、動物において成長ホルモン関連物質の放出を延長するための有効量のポリグリセロールエステルならびに生物適合性の疎水性媒体(例えば、油)を含む担体中に成長ホルモン関連物質(成長ホルモンおよび成長ホルモン放出因子からなる群から選ばれる)を含有する注射可能な長期放出製剤からなる組成物が提供される。

【0005】別の好ましい態様では、成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子で動物を処置するための組成物を製造するための方法が提供される。この方法は、生物適合性の疎水性媒体およびポリグリセロールエステルを含む担体中に成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子を導入して注射可能な長期放出製剤を得ることからなる。好ましい様式では、ポリグリセロールエステルと生物適合性の疎水性媒体を高温で混合して担体を得、この担体を冷却し、次いでこの担体中に成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子を分散させる。ポリグリセロールエステルは、動物において成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子の放出を延長するに有効な量で含まれる。

【0006】本発明のさらに別の好ましい態様においては、動物に成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子を投与するための方法が提供される。この方法は、動物における成長ホルモン関連物質の放出を延長するための有効量のポリグリセロールエステルおよび生物適合性の疎水性媒体を含む担体中に成長ホルモンおよび成長ホルモン放出因子からなる群から選ばれる成長ホルモン関連物質を含有する注射可能な長期放出製剤を動物に注射する段階を特徴とする。

【0007】即ち、本発明は有効性が高くかつ製造が容

易な長期放出組成物を提供するものである。さらに、この有効性は注射可能なペースト状組成物において達成することができ、成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子を他の物質と共に強制圧縮して固体の移植体を形成させることを必要としない。また、本発明の処置は、例えば固体の長期放出移植体を用いたときに必要となる切開を行わずに実施することができる。さらに、これらの利点は、投与の1箇月後までおよびそれを越えて成長ホルモンの有効な長期放出を与えながら、また、投与の2週間後までおよびそれを越えて成長ホルモンレベルの上昇を引き起こすように成長ホルモン放出因子の長期放出を与えながら達成することができる。本発明の他の態様、特徴および利点は以下の記述および特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【0008】図面の説明

図1および図2は、本発明の成長ホルモン製剤についての、注射後の血漿ウシ成長ホルモンレベル[血漿1mlあたりのng (ng/ml)]と時間(日数)の関係を示すグラフである。図3～図6は、本発明の成長ホルモン放出因子製剤についての、注射後の血漿成長ホルモンレベル(ng/ml)と時間(日数)の関係を示すグラフである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明の本質の理解を容易にするために特定の態様について言及し、これを具体的な用語でもって説明する。しかし、これによって本発明の範囲が限定されるものではなく、本発明が関係している分野の技術者が普通に行なうような本明細書記載の本発明の本質の修正、一層の修飾および応用が意図されていることは理解されよう。

【0010】上記のように、本発明の好ましい態様は、組成物として、動物において成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子の放出を延長するための有効量のポリグリセロールエステルと生物適合性の疎水性媒体(油など)を含む担体中に成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子を含有する注射可能な長期放出製剤を提供するものである。この製剤は、注射後の長期間にわたる動物への有効量のホルモンまたは放出因子の供給を与える。動物は内生の成長ホルモンを産生する任意の種であってよく、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウマ、鳥、魚およびヒトなどの脊椎動物種が含まれる。

【0011】本発明は、成長ホルモンおよび成長ホルモン放出因子(以下においては「GRF」と記すが、成長放出因子、成長ホルモン放出ホルモン、成長放出ホルモンおよびソマトクリニンとしても普通に知られている)の有効かつ長期の放出が、ポリグリセロールエステルと油または同様の媒体を含む担体中に活性物質(即ち、成長ホルモンまたはGRF)が存在している注射可能な製剤によって達成できるという発見に基づいている。好ましい態様においては、成長ホルモンまたはGRFは担体と単なる混合状態にあり、従って、ホットメルト法など

によって粒子中に導入する必要がない。即ち、本明細書中で用いる「単なる混合状態にある」なる用語は、成長ホルモンまたはGRFと溶融したエステル(後に固化する)を混合することによって成長ホルモンまたはGRFをポリグリセロールエステル中に導入したものではないことを記述するものである。その代わりに、本発明の好ましい製剤は、疎水性媒体とポリグリセロールエステルを含む担体と単なる混合状態で生物活性物質を含有しており、製剤全体は活性物質の長期放出を与える注射可能なペースト状にある。その結果、本発明の製剤は製造が容易である。

【0012】本発明において使用される成長ホルモンまたはGRFは、天然の成長ホルモンまたは天然のGRFの生物学的性質を示す天然または合成に由来する任意の物質であってよい。天然の成長ホルモンまたはGRFは、例えばウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、ブタ、鳥、魚、ヒトなどのあらゆる種のものであってよい。天然の成長ホルモンまたはGRFは動物の適当な腺組織から抽出され、それを行なうための方法は煩雑なものではあるが既知である。しかし、現在では遺伝的に修飾された微生物を用いることによって成長ホルモン、GRFおよびその他のこのような物質を合成することは十分に確立された手段である。このような方法によって修飾された成長ホルモンまたはGRF、即ち天然の成長ホルモンまたはGRFとはその構造が異なっているが天然の成長ホルモンまたはGRFの生物学的活性は保持している物質を得るのが好都合であるか、または一層好ましいことも多い。例えば、修飾型の成長ホルモンまたはGRFはポリペプチド鎖の一方または両方の末端に1またはそれ以上の付加的なアミノ酸を含有していることがあり、天然の成長ホルモンまたはGRFのアミノ酸配列とは異なる配列を有していることがあり、また、天然の成長ホルモンまたは成長ホルモン放出因子の活性フラグメントであることもある。例えば、GRFの場合には、天然のGRF、天然のGRFのプレタンパク質および天然のGRFのフラグメント(例えば、29アミノ酸の成長ホルモン放出因子)が成長ホルモン量の上昇を引き起こすことが知られている。別の修飾は当業者の理解するところであろう。従って、本明細書において「成長ホルモン」および「成長ホルモン放出因子」(または、「GRF」)なる用語は、天然の成長ホルモンおよびGRF、ならびに天然の成長ホルモンまたはGRFの生物学的性質と同じ性質を有し、構造が同一または異なっていることもある合成によって得た物質の両方を指すように用いる。

【0013】本発明は、ウシ成長ホルモン(合成によって得た修飾体を含む)を用いて実施するのが特に好ましい。合成によって得たウシ成長ホルモンの2つの例は、ソミドボブ(somidobove)およびソメトリボブ(sometribove)として知られている化合物である。また、本発明は、ブタおよびウシ成長ホルモン放出因子ならびに合成

によって得たこれら因子の修飾体を用いて実施するのが好ましい。特に好ましい例は、後記の実施例23において同定した成長ホルモン放出因子である。

【0014】理解されるであろうが、成長ホルモンまたはGRFは種々の物理形態で供給することができる。例えば、これは粉末(空気粉碎して粒子径を小さくしたものなど)、顆粒などであってよい。現在のところでは、EPO 0384752(1990年8月29日公開)に教示されている空気粉碎した粉末形態のウシ成長ホルモンが好ましい。

【0015】本明細書中の「ポリグリセロールエステル」なる用語は当分野で用いるように用いる。即ち、「グリセロール」は単純な化合物である $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$ を指す。ポリグリセロールはグリセロールの重合体を意味する。即ち、本発明における「ポリグリセロール」は、式： $\text{HO}-[\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{O}]_n\text{H}$ (ここで、 n は少なくとも2であり、通常は12を越えることはない)で示される化合物を意味する。ポリグリセロールには、例えばジグリセロール、トリグリセロール、テトラグリセロール、ペンタグリセロール、ヘキサグリセロール、ヘプタグリセロール、ノナグリセロール、およびデカグリセロールが含まれる。さらに、「ポリグリセロールエステル」は、少なくとも部分的なエステル化が存在していることを意味する(即ち、1またはそれ以上のOH基がエステル化されている)。特定のポリグリセロール中のエステル化部位の最大数は、式： $n+2$ で示される。本発明のためには、このエステルの内容は必須ではない。このエステル化は、約4〜30個の炭素原子、通常は約12〜約22個の炭素原子(カルボン酸炭素原子をこの数に含む)を有する脂肪酸によるのが普通である。適当なエステル基には以下のものが含まれる：ラウリン酸エステル、ミリスチン酸エステル、パルミチン酸エステル、ステアリン酸エステル、アラキシン酸エステル、ベヘン酸エステル、リグノセリン酸エステル、パルミトール酸エステル、オレイン酸エステル、リノール酸エステル、リノレン酸エステル、アラキドン酸エステルなど。

【0016】グリセロールおよびポリグリセロールエステルに関するさらに有用な情報は、文献に記載されている[V.K.Babayan, 多官能性ポリグリセロールおよびそのエステル, *Food Product Development*中, 4月-5月(1968)]。

【0017】しかし、ある種の好ましさが見い出された。好ましいものの1つは、完全にエステル化されたポリグリセロール、即ち $n+2$ のエステル基が存在しているポリグリセロールである。さらに、ポリグリセロールには液体または半固体(即ち、「ペースト」)の種々のものが含まれるが、半固体であるものが好ましいことがわかった。これらの好ましさに基づく、以下に挙げるものが本発明において使用するに好ましい物質である：一般的にジグリセロール・テトラエステル類、ジグリセ

ロール・テトラステアリン酸エステル、一般的にトリグリセロール・ペンタエステル類、一般的にテトラグリセロール・ヘキサエステル類、一般的にペンタグリセロール・ヘプタエステル類、一般的にヘキサグリセロール・オクタエステル類、一般的にデカグリセロール・ドデカエステル類。他の好ましいポリグリセロールエステルは容易にわかるであろう。

【0018】ポリグリセロールエステルは、処置される動物において成長ホルモンまたはGRFの長期放出を付与するに十分な量で含まれる。例えば、好ましい成長ホルモン製剤は、注射後の少なくとも14日間、より好ましくは少なくとも21日間、さらに好ましくは注射後の少なくとも約28日間、動物において成長ホルモン量の増加を与えるであろう。好ましいGRF製剤は、注射後の少なくとも7日間、より好ましくは少なくとも約14日間、動物において成長ホルモン量の増加を与えるであろう。通常、好ましい本発明製剤は、特定の媒体、成長ホルモンまたはGRFおよび他の含有させる成分、ならびに最終製剤の所望の機能的な、物理的な、およびその他の性質などの因子に依存して、約5重量%〜約60重量%のポリグリセロールエステルからなる担体含有しているであろう。さらに好ましい製剤は、約20重量%〜約60重量%のポリグリセロールエステルからなる担体含有している。

【0019】理解されるであろうが、あらゆる生物適合性の油またはその他の疎水性媒体が本発明に適している。代表的な油は、室温で液体である鉱油および種々の他の油であり、ピーナツ油、ゴマ油およびダイズ油を含むがこれらに限定はされない。この疎水性媒体は全製剤の所望の粘度を与えるに十分な量で含まれるが、勿論、状況に応じて変化するであろう。通常、この担体は約40重量%〜約95重量%の媒体からなり、より好ましい製剤においては約40重量%〜約80重量%の媒体からなる。ゴマ油がこれまでの結果から好ましい。

【0020】ポリグリセロールエステルと媒体の相対量については、好ましい製剤のポリグリセロールの油に対する重量比は約10:90〜約60:40である。

【0021】注射可能な製剤は有効量の成長ホルモンまたはGRFを含有している。この量の決定は当分野の技術的範囲内である。ウシ成長ホルモンの場合、それは好ましくは製剤の約5重量%〜約50重量%の量で、さらに好ましくは約10重量%〜約25重量%の量で含まれている。GRFの場合、それは好ましくは製剤の約10重量%〜約40重量%の量で含まれている。

【0022】この油とポリグリセロールエステルに加えて、種々の既知の補助剤または賦形剤を担体中に存在させてもよい。これらには、例えば、蜜ろう、モノステアリン酸アルミニウム、ブラジルロウヤシ、パラフィンなどが含まれる。また、スクロースやポリエチレングリコールなどの溶解促進剤、染料、保存剤、抗生物質、抗酸

化剤、安定剤およびその他の通常の成分を含有させてもよい。これら追加の成分を存在させるときには、通常、これらを担体の約0.01重量%～約10重量%で含有させる。

【0023】本発明の別の特徴は、後記実施例および添付の図面で説明するように、デキストランなどの多糖を担体中に含有させることによって成長ホルモンおよびGRFの放出を劇的に延長することができるという驚くべき発見に関する。即ち、成長ホルモンまたはGRF、ならびに疎水性媒体、ポリグリセロールエステルおよび放出をさらに延長するに十分なデキストランを含有する担体からなる注射可能な長期放出製剤は、本発明の別の重要な態様を提供する。これらの好ましい製剤においては、十分量のデキストランを含有させて、注射器で投与するに適した製剤の全体像は維持しながら所望の成長ホルモンまたはGRFの長期放出プロファイルを得る。通常、デキストランは存在するポリグリセロールエステルおよび疎水性媒体に対して約1重量%～約10重量%の範囲内で含有させるが、後記実施例10に示すように成長ホルモンを用いたこれまでの研究では少なくとも約8重量%の量が高い有効性を与え、後記実施例14～16および20～22に示すようにGRFを用いたこれまでの研究では少なくとも約5重量%の量が高い有効性を与える。

【0024】通常、本発明の製剤はポリグリセロールエステルを疎水性媒体中に加熱・混合して担体を配合することによって製造することができる。次いで、この担体を、例えば約40～45℃またはそれ以下の温度、好都合には周囲温度(例えば、約25℃)まで冷却し、成長ホルモンまたはGRFを所望の量で担体と混合する。デキストランを含有させるときには、これを冷却と成長ホルモンまたはGRFの添加の前に媒体中に混合することができる。

【0025】本発明の好ましい製剤のすべては、例えば14ゲージの注射針で注射可能であり、皮下間隙への注射によって投与することができる。

【0026】

【実施例】本発明の本質および利点の一層の理解を容易にするために以下に実施例を挙げる。これら実施例が説明のためのものであり、本発明を限定するものではないことは理解されよう。

実施例1～3 成長ホルモン製剤の調製

ジグリセロール・テトラステアリン酸エステル(2952mg)をゴマ油(4428mg)と混合し(ポリグリセロールエステルの油媒体に対する40:60の重量比が得られる)、得られた混合物をホットプレート上で暖めてこれら成分を溶融および混合することによって担体を調製した。次いで、この担体をリスト(手首)攪拌機で室温(約

25℃)まで冷却した。担体の冷却の後、ソミドボブ(空気粉碎、81.5%有効度)(1620mg)を加え、スパチュラを用いて室温で混合した。14.67%のソミドボブを含有する得られた本発明の製剤(EX1)を10ccの注射器に入れ、これから4本の6cc注射器に1.91g±5%となるまで注入した。それぞれ35:65および20:80の重量比(ジグリセロール・テトラステアリン酸エステル:ゴマ油)を用いることを除き、上記のようにしてさらに2種類の本発明製剤を調製した。得られたペースト状製剤をそれぞれEX2およびEX3と命名した。

【0027】投与と試験

血漿試料をヒツジ対象から採取し、それぞれに試験して処置前の血漿成長ホルモン量を測定した。次いで、製剤EX1、EX2およびEX3のそれぞれをそれぞれのヒツジ対象に皮下注射し、32日間にわたって数日毎に血漿のウシ成長ホルモン量をモニターした。この結果を図1に示す。図1は、それぞれの対象についての時間と血漿成長ホルモン量の関係を示すグラフである。この図に示されているように、EX1、EX2およびEX3製剤は極めて有利な長期放出プロファイルを与える。

【0028】実施例4

別の成長ホルモン製剤を次のように調製した。ゴマ油(6642mg)をヘキサグリセロール・ジステアリン酸エステル(738mg)と混合し、得られた混合物をホットプレート上で暖めてこれら成分を溶融および混合することによって担体を調製した。次いで、この担体をリスト攪拌機で室温(約25℃)まで冷却した。担体の冷却の後、ソミドボブ(空気粉碎、81.5%有効度)(1620mg)を加え、スパチュラを用いて室温で混合した。得られた製剤(EX4)を10ccの注射器に入れ、これから4本の6cc注射器に1.91g±5%となるように注入した。実施例1～3の記載と同様に試験すると、EX4製剤を用いたときにも好都合な長期放出の性質が得られた。

【0029】実施例5～9

いくつかの別の成長ホルモン製剤を、以下の表1にまとめるように本発明に従って調製した。表示した媒体を表示した比率でポリグリセロールエステルと混合し(合計10000mg)、ホットプレート上で暖めて溶融および混合した。次に、この混合物を、室温まで冷却されるまでリスト運動攪拌機上に置いた。次いで、それぞれの担体中にソミドボブを14.67重量%で配合し、スパチュラを用いて室温で混合した。次に、得られた軽ペースト状の製剤を5ccの注射器に入れ、冷凍庫に一晩入れた。その翌日に、この製剤の14ゲージ注射針による注射可能性を試験した。この結果を表1に示す。

【表1】

No.	エステル			
5	ジグリセロール・ テトラステアリン 酸エステル	デカグリセロール ・デカオレイン酸 エステル	30/70	注射可能
6	ヘキサグリセロー ル・ジステアリン 酸エステル	ゴマ油	5/95	注射可能
7	デカグリセロール ・デカステアリン 酸エステル	ゴマ油	30/70	注射可能
8	ヘキサグリセロー ル・ジステアリン 酸エステル	デカグリセロール ・デカオレイン酸 エステル	20/80	注射可能

^a ポリグリセロールエステルの媒体に対する重量比

【0030】実施例9～10

1組の実験において、デキストランなどの多糖をポリグリセロールエステル含有の製剤に添加することによってウシ成長ホルモンの放出期間を延長することができることを示した。即ち、ジグリセロール・テトラステアリン酸エステル(2480mg)およびデキストラン(分子量150,000)(295mg)をゴマ油(4605mg)と混ぜ(33.6:62.4:4.0重量比のポリグリセロールエステル:油:デキストランが得られる)、暖めて混合した。次いで、この混合物を攪拌しながら室温まで冷却し、続いてソミドボブ(空気粉碎、81.5%有効度)(1620mg)をスパチュラを用いて担体中に混合し、14.67重量%のソミドボブを含有する製剤(EX9)を得た。30:8:62重量比のポリグリセロールエステル:デキストラン:油の担体を調製することを除き、上記と同様にして別のデキストラン含有のペースト状製剤(EX10)を調製した。これら2種類の製剤をEX5と共に試験した。この試験の結果を図2に示す。図2からわかるように、放出の有意の延長が得られるに十分な量でデキストランを加えることができる。EX10の結果

を見ると、EX1を凌ぎそれを越えることすらある長期放出を観察することができる(実施例1および図1を参照)。

【0031】実施例11～22 GRF製剤の調製
実施例23に記載のGRF類似体の製剤を、本発明に従って以下の表2にまとめるように調製した。表示した媒体を表示した重量比でポリグリセロールエステルと混合し(合計2800mg)、ホットプレート上で暖めて溶融および混合した(70℃)。次に、この混合物をホットプレートから取り、室温まで冷却し、次いでポリグリセロールエステルが固化し始めたときにGRFを製剤の20重量%まで加え、スパチュラを用いて担体中に攪拌した。次に、この混合物を室温まで冷却し、もう一度混合した。得られた軽ペースト状の製剤を2日間冷凍し、次いで室温まで暖めた。次に、この製剤をもう一度攪拌し、3ccの注射器に入れた。次いで、製剤をこの3ccの注射器から1ccの注射器にそれぞれ0.30g±0.01gの量で入れた。

【表2】

実施例 No.	ポリグリセロール エステル	媒体	その他	比率 ^a
11	ジグリセロール・ テトラステアリン 酸エステル	ゴマ油	—	40/60
12	ジグリセロール・ テトラステアリン 酸エステル	ゴマ油	—	30/70
13	ジグリセロール・ テトラステアリン 酸エステル	ゴマ油	—	10/90
14	ジグリセロール・ テトラステアリン 酸エステル	ゴマ油	デキストラン	37.5/57.5/5
15	ジグリセロール・	ゴマ油	デキストラン	27.5/67.5/5

プラスミドpHS452は、その宿主細胞を適当な条件

下で培養したときに大量のpGRF (2-76) OHポリペプチドを産生する組換えDNA発現ベクターである。大腸菌K12 RV308/pHS190の凍結乾燥品をNorthern Regional Research Laboratories (NRRL) [Peoria, IL 61604]から受託番号NRRL B-18410 (寄託日: 1988年9月9日)のもとで入手することができ、これを以下の過程における「培養物」として直接用いた。5mg/mlのテトラサイクリンを含有するTYブロス[1Lあたりにトリプトン(10g)、NaCl(5g)、および酵母エキス(5g)](10ml)に大腸菌K12 RV308/pHS190の培養物を接種し、暴気しながら30℃で一晩(15~18時間)インキュベートした。5mg/mlのテトラサイクリンを含有するTYブロス(1L)に大腸菌K12 RV308/pHS190の培養物を接種し、暴気しながら32℃で一晩(15~18時間)インキュベートした。次いで、この培養物をSorvall [DuPont Co., Instrument Products, Biomedical Division, Newtown, CT 06470] GSAローター中、4℃で10分間、5200rpmで遠心して細胞をペレット化した。得られた上清は捨てた。この細胞ペレットを25%スクロースおよび50mM EDTA(エチレンジアミン四酢酸)の溶液(28ml)に再懸濁した。この細胞懸濁液に、0.25Mトリス-HCl[トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン・塩化水素](pH8.0)中の20mg/mlリゾチームの溶液(約1ml)および0.5M EDTA(pH8.0)(約1.5ml)を加え、混合した。得られた混合物を氷上で15分間インキュベートした。溶解溶液[10% Triton[®] X-100 (Rohm & Haas)(3ml)、0.25MEDTA(pH8.0)(7.5ml)、および水(7ml)を混合することによって調製](3ml)をリゾチーム処理した細胞に穏やかに混合しながら加えた。得られた溶液を氷上でさらに15分間インキュベートした。Sorvall SS34ローター中、4℃で約45分間、17,000rpmで遠心することによって溶液から細胞の残骸を除去した。この上清(~30ml)にCsCl(約28.6g)および5mg/ml臭化エチジウム溶液(~1ml)を加えた。次いで、その容量を水により40mlに調節し、溶液を超遠心管に移した。この管を密封し、溶液をTi70ローター(Beckman, 7360N, Lincoln Avenue, Lincolnwood, IL 60646)中、49,500rpmで~18時間遠心した。紫外光で可視化したプラスミドのバンドを単離し、CsCl飽和のイソプロパノールで抽出して臭化エチジウムを除去し、~20倍容量のTE緩衝液[10mMトリス-HCl(pH7.5)および1mMEDTA]に対し、それを3回交換して透析した。この透析液を集め、次いで2倍容量のエタノールと0.05倍容量の3M酢酸ナトリウム溶液を加えた。このエタノール混合液を-20℃まで冷却し、SS34ローター中、-10℃で30分間、10,000rpmで遠心することによってプラスミドDNAをペレット化した。得られたペレットをTE緩衝液(~1ml)に再懸濁し、次いで等容量のフ

ェノール:クロロホルム混合液(1:1, v/v)で抽出した。0.1倍容量の3M酢酸ナトリウムおよび2倍容量のエタノールを加え、次いで-20℃で~30分間インキュベートし、SS34ローター中で20分間、15,000rpmで遠心することによって、水相中のDNAを回収した。得られたDNAペレットを初めに70%エタノールで、次いで100%エタノールですすぎ、そして乾燥した。

【0035】上記の操作によって得たプラスミドpHS190のDNA(~1.0mg)を0.1X TE緩衝液(1.5ml)に懸濁し、-20℃で保存した。プラスミドpHS190 DNA(約1.0mg)を、EcoRI緩衝液[100mMトリス-HCl(pH7.5)、5mM MgCl₂、50mM NaCl]中にこのDNAを含む反応液において制限酵素EcoRI(~10単位)を用いて消化した。反応液を37℃で2時間インキュベートした。5'突出末端を平滑末端に変換するため、0.5mMの各dNTP(dATP、dCTP、dGTP、およびTTP)を1~5単位のクレノウ・フラグメント[Boehringer Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Dr., P.O.Box 50816, Indianapolis, Indiana 46250]と共に加えた。この反応混合物をフェノール、フェノール/クロロホルム、クロロホルムで抽出し、次いでエタノール沈澱させた。次に、このプラスミドを、40mMトリス-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、10mMジチオトレイトール(DTT)、0.5mMアデノシン三リン酸、および1UのT4 DNAリガーゼ[Boehringer-Mannheim Biochemicals, 7941 Castleway Drive, Indianapolis, IN 46250]を含む溶液(50ml)に再懸濁した。この反応液を14℃で一晩インキュベートした。この連結した混合物を、Maniatisら[Molecular Cloning, pp.250-251, Cold Spring Harbor Press, 1982]の次の操作により、大腸菌K12 RV308(NRRLからNRRL B-15624として入手できる)に導入した。500mlフラスコ中のTYブロス(100ml)にRV308の一晩培養物(1ml)を接種した。細胞を37℃で激しく振盪しながら~5x10⁷細胞/mlの密度になるまで増殖させた。この培養物を氷上に10分間置き、次に4℃で5分間、4000xgで遠心した。この細胞を氷冷の10mMトリス-HCl(pH8.0)中の50mM CaCl₂(50ml)に再懸濁した。この細胞をもう一度氷上で15分間インキュベートし、再遠心した。次いで、細胞を塩化カルシウム溶液(3.3ml)に再懸濁した。連結混合物を細胞(200ml)に加え、氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞を42℃の水浴に2分間移した。TYブロス(1ml)を管に加え、細胞を30℃で1時間インキュベートした。次に、この200μlを、5mg/mlテトラサイクリンを含むTY寒天(TYブロス+1.5%寒天)プレートに蒔き、30℃で一晩増殖させた。次に、プラスミドを水(10ml)に再懸濁した。このプラスミドをXbaIおよびBamHIで消化すること

によってベクターを得た。Xba I (約1ml; ~10単位)を、プラスミドDNA(10ml; ~10mg)および10X Xba I 緩衝液[500mM トリス-HCl(pH8.0)、100mM MgCl₂、および500mM NaCl](5ml)に加えた。37℃で90分間インキュベートした後、5M NaCl(0.5ml)およびBamH I (1ml; 10単位)を加え、37℃でさらに90分間インキュベートを続けた。次いで、この反応混合物をアガロースゲル電気泳動にか

ATG GCT GAT GCT ATT TTT ACT AAT AAT TAT CGA CGC GTT

CTT ACT CAG CTG TCT GCT CGT CGT CTG CTG CAG GAT ATT

CTG TCT CGT CAG CAG GGT GAA CGT AAC CAG GAA CAA GGA

GCT CGT GTT CGT CTT GGT CGT CAG GTT GAT TCT CTG TGG

GCT GAT CAA CGT CAG CTT GCT CTC GAG TCT ATC CTG GCT

ACT CTG CTG CAG GAA CAT CGT AAT TCT CAG GGT TAA TAG

を合成した。配列をオリゴヌクレオチドに分割し、次いでこれらオリゴヌクレオチドを連結することによって合成遺伝子の構築を行なう方法は、実質的にBrownらの方法[Methods in Enzymology 68: 109 (1979)]に従った。次いで、暗号配列を含有するDNAを、上で作成したXba I - BamH I ベクターフラグメントと混合し、連結した。次に、この連結した混合物を上記のように大腸菌K12 RV308に導入した。テトラサイクリン耐性の形質転換体からのプラスミドDNAを制限酵素消化によって分析し、プラスミドがpHS452であることを確認した。

【0037】23.B. 組換えpGRFペプチドの単離
23.B.1. 大腸菌中でのpGRF類似体の発現
大腸菌K12 RV308/pHS452を、細胞が対数期半ばに達するまで、5mg/mlテトラサイクリンを含むTYブロスにおいて32℃で増殖させた。この混合物の温度を42℃まで上げ、さらに約3時間インキュベートを続けた。プラスミドpHS452においてGRF類似体を発現させるように設置したラムダpLプロモーターのcI857温度感受性リプレッサーは42℃で不活性化され、従ってGRF類似体の発現が可能になる。

【0038】23.B.2. GRF類似体を含有する顆粒の単離

本明細書中に例示したような高レベルの大腸菌発現系を用いたときには、タンパク質産物は細胞封入体または顆粒中に隔離される。GRF類似体を含有している顆粒を単離し、可溶化して目的のGRFペプチドを単離した。初めに、全細胞を遠心し、次いで10℃で水に再懸濁し

け、~5.75kbのXba I - BamH I ベクターフラグメントを電気溶離とそれに続くエタノール沈澱によって単離した。

【0036】当業者には周知である方法を用い、Applied Biosystemsの380B型合成機によって以下のDNA配列:

【化2】

た。この細胞スラリーをGualinホモジナイザー中、800 Opsigでホモジナイズした。次に、このホモジナイズしたスラリーを水で希釈し、10分間攪拌し、次いで10%水酸化ナトリウムを用いてそのpHを8.4~8.6に調節した。次に、この混合物を遠心した。この固形分がGRF類似体を含有している顆粒であり、これを後の使用時まで-70℃で凍結させた。

【0039】23.B.3. GRF類似体の最終的な精製
上記の実施例23.B.2で調製した顆粒を2~5℃で解凍した。この顆粒を、10倍容量の0.05N酢酸-7M尿素を添加し、次いで5~8分間ホモジナイズすることによって可溶化した。次に、このpHを10%塩酸の添加によって2.5~2.6に調節した。この混合物を2~5℃で12~15時間攪拌した。この溶液を、Dicalite Speedex Ⅱ 過助剤[Grefco, Torrance, CA]で被覆されたSparklerフィルターによる過ろによって浄化した。この酢酸-尿素溶液による希釈によって、溶液の伝導度は4000 mohm以下に減少した。S Sepharose[®] [Pharmacia, 800 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854]樹脂を用いてカチオン交換カラムを調製した。このカラムは、50gの物質に対して1Lの樹脂を含有していた。物質を0.1 L/cm/時間の流速でこのカラムに加え、酢酸-尿素溶液中の0.1 M塩化ナトリウム(2カラム容量)で洗浄した。GRF類似体は、酢酸-尿素中の0.25 Mから1.6 Mの塩化ナトリウムの直線勾配液によって溶離した(0.1カラム容量の分画を集めながらそれぞれの3カラム容量を用いる)。GRF類似体を含有している分画は、伝導度、O.D.₂₇₆、HPLCおよびポリ

アクリルアミドゲル電気泳動によって同定した。次いで、分画をプールした。等容量の酢酸－尿素溶液をプールした分画に加えた。次いで、この物質を、1 Lの樹脂に対して50gのタンパク質を供給するように設定した、酢酸－尿素中にSephacrose[®]樹脂を含むカラムにかけた。GRF類似体の分画を、酢酸－尿素中の0.25 M～1.2 M塩化ナトリウムの直線勾配液で溶離した。0.1カラム容量の分画を集めた。この分画を先に記したように分析し、GRF類似体を含む分画をプールした。Sephadex[®] G-15 (Pharmacia)カラムを、上記のプールした分画の容量の5倍のカラム容量を用いて0.02 Mグリシン(pH 2.5)中で調製した。O.D.₂₇₆ピークを含有する分画を単離した。次に、10%アセトニトリル－0.02 Mグリシン(pH 2.5)中にSP 20 Ss樹脂(Sephacolumn[®], Mitsubishi Chemical, Tokyo)を含むカラムを調製した。プールしたGRF類似体を含む溶液をアセトニトリル中に10%となるように調整し、1時間あたり1.5～2カラム容量の流速でカラムに加えた。このカラムを2カラム容量のアセトニトリル－グリシン緩衝液で洗浄した。GRF類似体を、3カラム容量の50%アセトニトリル－0.02 Mグリシンと混合される3カラム容量の10%アセトニトリル－0.02 Mグリシンからなる勾配液で溶離した。0.1カラム容量の分画を集め、GRF類似体の分析を行なった。次に、GRF類似体を含む物質を、0.25 M酢酸中で平衡化したSephadex[®] G 15カラムのクロマトグラフィーにかけた。次いで、O.D.₂₇₆ピークを単離し、後の使用時まで凍結乾燥した。

【0040】23.C. p-メチルヒプロイルpGRF (2-76)OHの調製

23.C.1. p-メチルベンゾイルグリシンの合成
グリシン(約7.5g)を、2N NaOH(105ml)およびジオキサン(50ml)からなる溶液に機械攪拌しながら0～5℃で溶解した。p-トルオイルクロリド(約14.9ml)をジオキサンで50ml容量まで希釈し、15～20分間で反応液に滴下した。この反応混合物を25℃(即ち、室温)に暖めながら一晩攪拌した。この反応液をNaOH水溶液で塩基性にし、ジエチルエーテルで抽出した。この水相を6N HClでpH 3.0に酸性化し、EtOAcで抽出した。このEtOAcをH₂Oで洗浄し、MgSO₄で乾燥し、汙過し、そして汉液を真空下でほぼ乾固するまで濃縮した。この固形分をEt₂Oに懸濁し、汉過し、真空下で乾燥して、後にp-メチル馬尿酸であることが示された物質(14.25g)を得た。この生成物の同定は、融点および元素燃焼分析(p-メチル馬尿酸の理論値と比較するのが好都合である)によって行なった。上で得られた化合物の融点は151～154℃であった。

【0041】23.C.2. p-メチルヒプロイルpGRF (2-76)OHの合成

実質的に上記実施例23.C.1の教示に従って調製した

p-メチル馬尿酸(約1.65g)を、ジメチルホルムアミド(DMF)(15ml)に攪拌および氷浴で冷却しながら溶解した。この溶液にN-ヒドロキシスクシンイミド(約1g)を加え、続いてDCC(1.9g)を加えた。この反応液を室温(25℃)に暖めながら一晩攪拌した。DCUの沈澱を汉過して単離し、汉液を真空下に濃縮した。残留の油をEt₂Oで希釈すると結晶化が起こった。この固体を汉過して単離し、Et₂Oで洗浄し、真空下で乾燥して融点が167～170℃の生成物(3.28g)を得た。この物質を元素燃焼分析にかけると、その結果はp-メチル馬尿酸のスクシンイミジルエステル(C₁₄H₁₄N₂O₅)で期待される理論値と良く一致した。実質的に上記実施例23.Aの教示に従って調製したpGRF (2-76)OH(約72mg)を、室温で攪拌しながら3mlの0.1 Mトリス-HCl(pH 7.8)、30%プロパノールに溶解した。この反応液にp-メチル馬尿酸のスクシンイミジルエステル(57mg)を加え、反応液を室温で攪拌し、N-(p-メチル)馬尿酸スクシンイミジルの導入から15分、1時間および2時間後に試料(5μl)を取って反応の進行を追跡した。これら試料のそれぞれを0.1% TFAで500mlまで希釈し、RP-HPLC分析用の0.46×15cm Vydac C18カラムに注入し、出発物質と比較した。2.5時間後に反応混合物を氷酢酸(約1ml)で酸性化し、2.2×28.5cmのSephadex G-10カラムにかけた。このカラムを10% HOAcで溶離し、分画(7.5ml)を集めた。それぞれの分画のABS₂₈₀を測定してポリペプチジル化合物の存在を調べた。ポリペプチドの存在を示した分画7～10を合わせ、凍結および乾燥させて、凍結乾燥物(70mg)を得た。

【0042】以上に本発明を詳しく説明したが、これは説明のためのものであり、限定のためのものではない。上記では好ましい態様だけが記載されており、本発明の思想の範囲内にある変化および修飾のすべてが保護されるべきであることは理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の成長ホルモン製剤についての、注射後の血漿ウシ成長ホルモンレベル(ng/ml)と時間(日数)の関係を示すグラフである。

【図2】 本発明の成長ホルモン製剤についての、注射後の血漿ウシ成長ホルモンレベル(ng/ml)と時間(日数)の関係を示すグラフである。

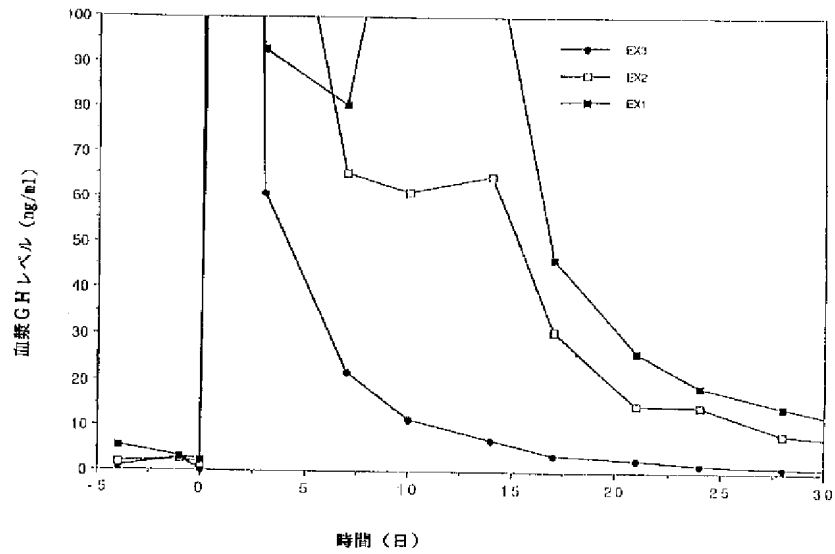
【図3】 本発明の成長ホルモン放出因子製剤についての、注射後の血漿成長ホルモンレベル(ng/ml)と時間(日数)の関係を示すグラフである。

【図4】 本発明の成長ホルモン放出因子製剤についての、注射後の血漿成長ホルモンレベル(ng/ml)と時間(日数)の関係を示すグラフである。

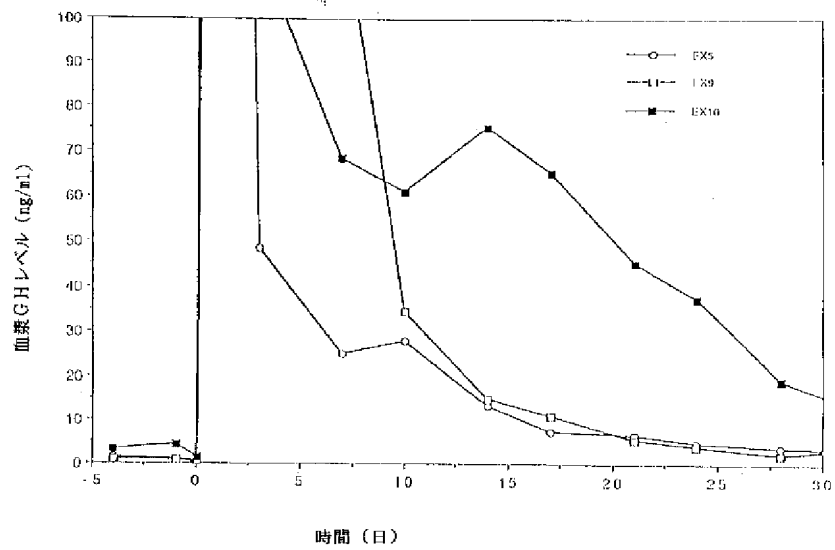
【図5】 本発明の成長ホルモン放出因子製剤についての、注射後の血漿成長ホルモンレベル(ng/ml)と時間(日数)の関係を示すグラフである。

【図6】 本発明の成長ホルモン放出因子製剤について (日数)の関係を示すグラフである。
の、注射後の血漿成長ホルモンレベル(ng/ml)と時間

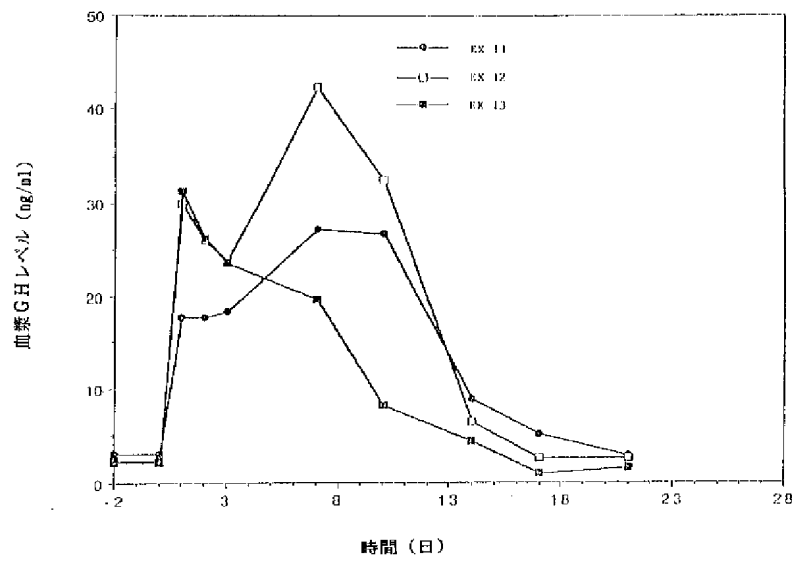
【図1】



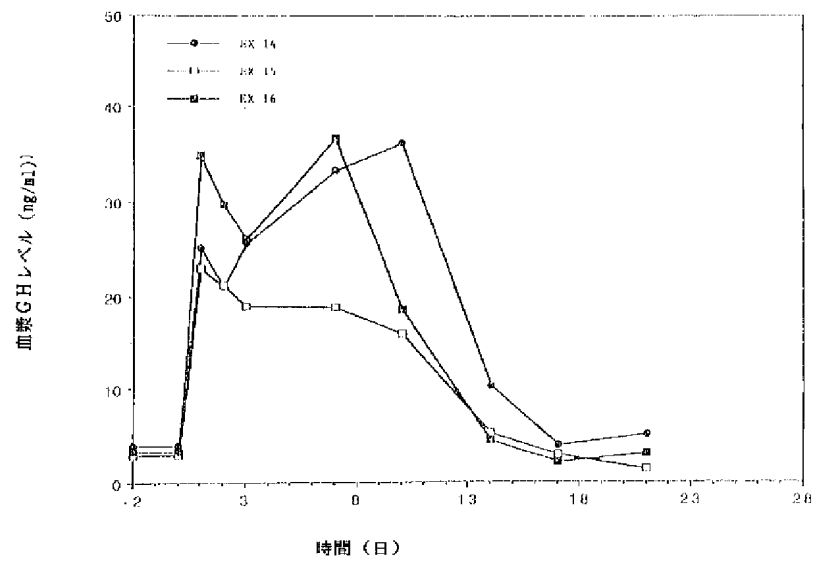
【図2】



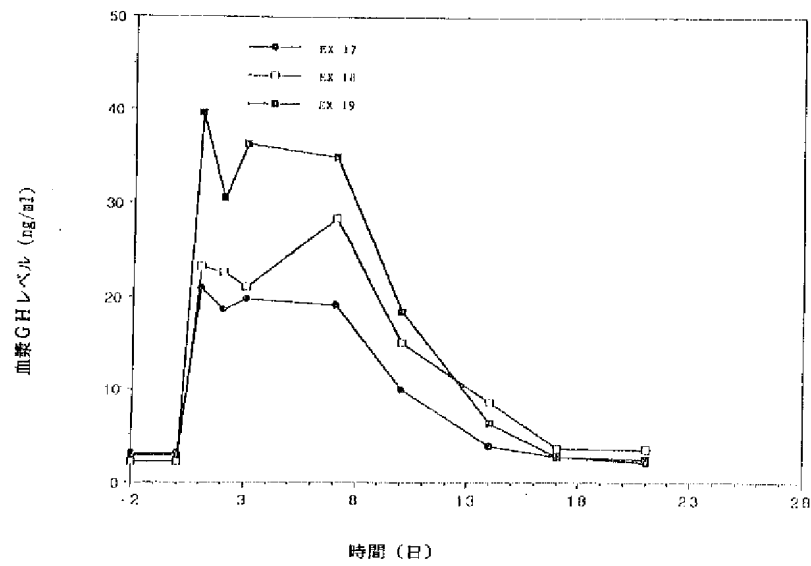
【図3】



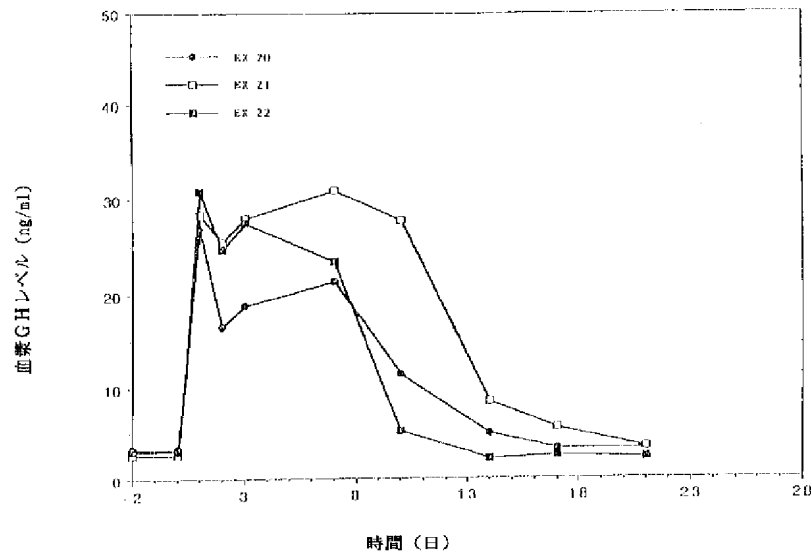
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 グレゴリー・フランク・ニーダム
 アメリカ合衆国46140インディアナ州グリ
 ーンフィールド、シャーウッド・ドライブ
 1203番